

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003年1月3日 (03.01.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/000683 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07D 403/12,  
403/14, 207/34, 487/04, 405/14

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/01775

(22) 国際出願日: 2002年2月27日 (27.02.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2001-190957 2001年6月25日 (25.06.2001) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術  
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY  
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市  
本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉山 弘  
(SUGIYAMA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒102-0081 東京都  
千代田区 四番町 8-6 1 1 Tokyo (JP). 飯田 博一  
(IIDA, Hirokazu) [JP/JP]; 〒770-0871 徳島県 徳島市 金沢 1-5-7 9-5 リバーサイド福井 2 0 4 Tokushima  
(JP). 斎藤 烈 (SAITO, Isao) [JP/JP]; 〒607-8242 京都府  
京都市 山科区 勤修寺柴山 1-2 1 Kyoto (JP). 斎藤 孝  
(SAITO, Takashi) [JP/JP]; 〒167-0031 東京都 杉並区  
本天沼 1-2 6-1 2 Tokyo (JP).(74) 代理人: 佐伯 憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都  
中央区 日本橋三丁目 1 5 番 2 号 高愛ビル 9 階 Tokyo  
(JP).

(81) 指定国 (国内): CA, JP, US.

規則 4.17 に規定する申立て:

— すべての指定国のための不利にならない開示又は新  
規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告書  
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する  
申立て2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF THE SOLID PHASE SYNTHESIS OF PYRROLE-IMIDAZOLE POLYAMIDE

(54) 発明の名称: ピロール-イミダゾールポリアミドの固相合成法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of producing a pyrrole-imidazole polyamide whereby a longer pyrrole-imidazole polyamide can be conveniently synthesized and a peptide (protein) can be easily transferred. According to this method, a pyrrole-imidazole polyamide having a carboxylate group which can be excised from a solid phase carrier at its end, makes it possible to directly transfer various functional groups and can exactly distinguish DNA sequences can be efficiently produced. A method of synthesizing a pyrrole-imidazole polyamide characterized by performing automatic synthesis by the solid phase Fmoc method with the use of a peptide synthesizer; a pyrrole-imidazole polyamide having a carboxyl group at its end obtained by this method; a pyrrole-imidazole polyamide having a DNA alkylation agent transferred into the carboxyl group at the end of the above-described pyrrole-imidazole polyamide; and a sequence-specific DNA alkylation method characterized by using the above compound.

[続葉有]

WO 03/000683 A1

BEST AVAILABLE COPY



---

(57) 要約:

より長いピロールーイミダゾールポリアミドを簡便に合成することが出来、蛋白質（ペプチド）の導入も容易なピロールーイミダゾールポリアミドの製造法であって、固相担体から切り出すことが可能なカルボン酸残基を末端に有し、種々の官能基を直接導入することが可能で、DNAの配列を正確に識別することができピロールーイミダゾールポリアミドを効率よく製造することが出来る製造法の提供。

ペプチド合成機を使用し、固相Fmoc法による自動合成法により合成することを特徴とする、ピロールーイミダゾールポリアミドの合成法、及びこれによって得られる末端にカルボキシル基を有するピロールーイミダゾールポリアミド、並びに該ピロールーイミダゾールポリアミドの末端のカルボキシル基にDNAアルキル化剤を導入してなるピロールーイミダゾールポリアミド、及び該化合物を用いることを特徴とする、配列特異的DNAアルキル化方法。

## 明 細 書

## ピロール-イミダゾールポリアミドの固相合成法

## ピロール-イミダゾールポリアミドの固相合成法

技術分野

本発明は、近年の活発な研究により、配列特異的にDNAと結合させることが出来ることが明らかとなり、遺伝子発現の制御等に有用な化合物として注目されているピロール-イミダゾールポリアミドの新規な合成法に関する。

背景技術

近年の活発なゲノム解析研究により、約30億のデオキシリボ核酸（DNA）の連なりから構成されているヒトゲノムの解明はほぼ終了した。今や時代は遺伝情報の元となる遺伝子の発見と解明、更には個人の体質の差を左右する遺伝子の一塩基変異多型（SNPs）の解明へと移ってきている。この研究の中で様々な遺伝子や遺伝情報が明らかとなっており、それらの遺伝情報を特異的に制御する化合物を合成することは、新時代の創薬技術として有用な手法であると考えられる。

本発明者らは、DNAのAT塩基対に富む部位に選択的に結合することが知られている抗生物質ディスタマイシンに着目し研究を続けてきているが、その一環として、ディスタマイシンの構成単位であるピロールアミドとその誘導体であるイミダゾールアミドとを組み合わせたシステムティックなディスタマイシン誘導体の合成を行い、得られた化合物の生化学的な検討を行っている。そして、その結果として、本発明者らは、これらの化合物はDNAのある特定部位に対して選択的に結合できる化合物であり、その選択性はピロールアミド（Py）とイミダゾールアミド（Im）の順序により決定できることを明らかにした。

更に本発明者らは、合成したピロール-イミダゾールポリアミドを用いて既存の癌細胞に対する細胞毒性試験を行うシステムティックなスクリーニング法を見出した。この手法は、ヒトゲノム計画の中で明らかにされるであろう、ある特定の癌細胞に特有のDNA配列を標的とする化合物群の一斉簡易スクリーニング法

である。構成単位であるピロールーイミダゾールアミドが8アミド存在する場合、その組み合わせは256種類に及ぶ。それらの化合物を同時にスクリーニングすることで、システマティックに細胞毒性を有する化合物を選択できる。無数の組み合わせのDNA選択的化合物ピロールーイミダゾールポリアミドから、その標的遺伝子に合わせて唯一の有用物質を導き出すことが出来得るようになる画期的なシステムであり、この発明に対して本発明者らは既に特許出願を行なっている（特開2001-136974号公報）。

ピロールーイミダゾールポリアミドの合成は、これまで液相法により行っていたが、この方法は他種類の合成に不向きであった。

一方、ピロールーイミダゾールポリアミドの固相合成法は米国カリフォルニア工科大学のダーバン教授によりt-BOC法が開発されているが（J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 6141-6146）、反応条件が厳しいため長鎖ピロールーイミダゾールポリアミドの合成は困難であり、また、応用性にも乏しい。更に市販の蛋白（ペプチド）合成機を利用した合成法ではないため蛋白質（ペプチド）の導入も容易ではない。また、末端にカルボキシル基を有するポリアミドの合成が難しく、末端をカルボン酸残基として固相から切り出す効率も悪いため、得られた長鎖ピロールーイミダゾールポリアミドを直接修飾して新たな反応性を持たせることも困難である。

また、スペインのマスカレナス教授や米国カリフォルニア大学ブルース教授によりポリピロールのFmoc合成法も報告されているが（Tetrahedron Lett., 1999, 40, 3621-3624; J. Am. Chem. Soc., 2001, 123, 2469-2477）、イミダゾールアミドを導入できていないためDNAの配列を正確に識別することができない。

#### 発明の開示

本発明は、上記した如き状況に鑑みなされたもので、より長いピロールーイミダゾールポリアミドを簡便に合成することが出来、蛋白質（ペプチド）の導入も容易なピロールーイミダゾールポリアミドの製造法であって、固相担体から切り出すことが可能なカルボン酸残基を末端に有し、種々の官能基を直接導入することが可能で、DNAの配列を正確に識別することができるピロールーイミダゾー

ルポリアミドを効率よく製造することが出来る該ポリアミドの製造法を提供することを目的とする。

本発明は、ペプチド合成機を使用し、固相 Fmoc 法による自動合成法により合成することを特徴とする、ピロールーイミダゾールポリアミドの合成法の発明である。

また、本発明は、末端にカルボキシル基を有するピロールーイミダゾールポリアミドの発明である。

更に、本発明は、上記ピロールーイミダゾールポリアミドの末端のカルボキシル基に DNA アルキル化剤を導入してなるピロールーイミダゾールポリアミドの発明である。

更にまた、本発明は、DNA アルキル化剤を導入した上記ピロールーイミダゾールポリアミドを用いることを特徴とする、配列特異的 DNA アルキル化方法の発明である。

また、本発明は、末端にカルボキシル基を有する FITC（フルオレセインイソチオシアネート）-ピロールーイミダゾールポリアミドコンジュゲートの発明である。

即ち、本発明者らは、より長いピロールーイミダゾールポリアミドを簡便に合成する手法として固相 Fmoc 法（Fmoc = 9-フルオレニルメトキシカルボニル）による自動合成法を開発した。無数の組み合わせのピロールーイミダゾールポリアミドを固相 Fmoc 法によるコンビナトリアル自動合成手法と、上で述べた本発明者らが開発したスクリーニング法を組み合わせることにより、生理活性をもつピロールーイミダゾールポリアミドを素早く選択することが出来る。また、本発明の方法によれば末端をカルボン酸残基として固相担体から切り出すことが可能なため、様々な官能基をピロールーイミダゾールポリアミドに導入することが可能である。例えば、DNA に対してアルキル化能をもつデュオカルマイシン、ピロロベンゾジアゼピン、ブレオマイシン、エンジン化合物、ナイトロジェンマスタード、またそれらの誘導体を導入することが可能である。また、この手法は市販の蛋白（ペプチド）合成機を利用した自動合成であるため、天然に

存在する蛋白質とピロールーイミダゾールポリアミドとのコンジュゲート、更には非天然蛋白質とのコンジュゲートの合成をも自動合成法で可能とする合成手法なのである。更にまた、Fmoc法はt-BOC法に比べて反応条件が緩和なため、蛋白質以外の有機化合物の中でも酸性条件で不安定な官能基を持つ化合物の導入も可能であり、その応用は幅広い。例えば、ピロールーイミダゾールポリアミドとDNAやRNAとのコンジュゲート、それらの誘導体とのコンジュゲートを自動合成することも可能である。

先に述べた如く、従来の方法は、例えば液相法は他種類の合成に不向きであり、また、t-BOC法は、反応条件がFmoc法に比べて厳しいため長鎖ピロールーイミダゾールポリアミドの合成は困難であり、また、応用性にも乏しい、更には市販の蛋白合成機を利用した合成ではないため蛋白質の導入も容易ではない、また、末端をカルボン酸残基として固相から切り出すのが難しいため、得られた長鎖ピロールーイミダゾールポリアミドを直接修飾して新たな反応性を持たせることも困難である等の問題点を有しており、更に、ポリピロールのFmoc合成法も、イミダゾールアミドを導入できていないためDNAの配列を正確に識別することができない等、何れも問題点を有しているが、本発明者らが開発した手法はこれらの問題点を全て解決した画期的な手法である。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、実施例4の(1)のDNAアルキル化実験における、DNAアルキル化剤のDNAに対する反応性を450merのDNAフラグメントを用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動法で解析した結果を示す。

第2図は、実施例4の(2)のDNAアルキル化実験における、DNAアルキル化剤のDNAに対する反応性を450merのDNAフラグメントを用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動法で解析した結果を示す。

第3図は、実施例4の(3)のDNAアルキル化実験における、DNAアルキル化剤のDNAに対する反応性を450merのDNAフラグメントを用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動法で解析した結果を示す。

### 発明を実施するための最良の形態

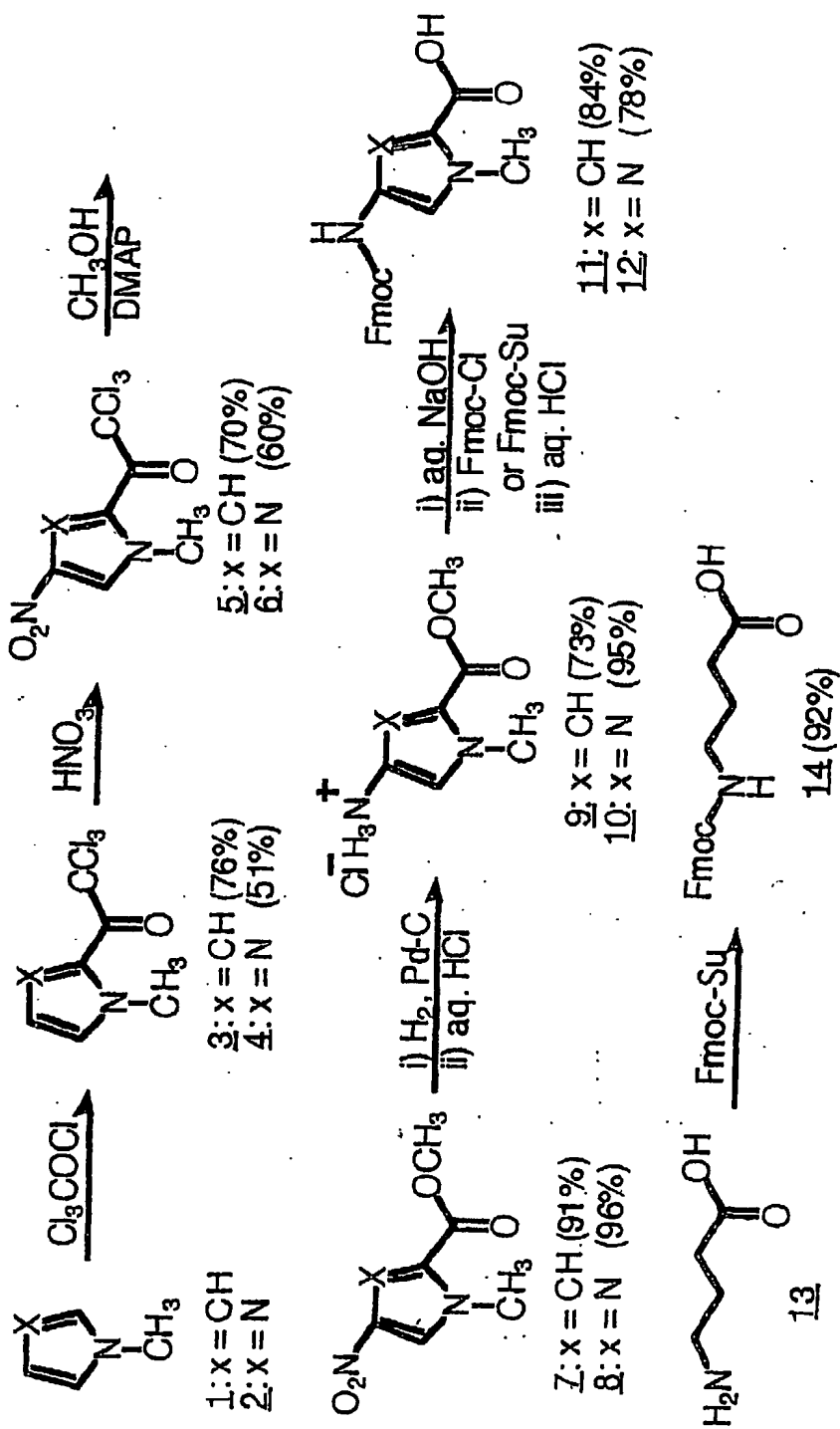
本発明の合成法によれば、末端にカルボキシル基を有するピロールイミダゾールポリアミドを簡便に且つ効率的に合成することが出来る。

末端にカルボキシル基を有するピロールイミダゾールポリアミドの具体例としては、例えば、末端に $\beta$ -アラニン残基を有するピロールイミダゾールポリアミドや末端に $\gamma$ -アミノ酪酸残基を有するピロールイミダゾールポリアミド等が挙げられる。

末端に $\beta$ -アラニン残基を有するピロールイミダゾールポリアミド或いは末端に $\gamma$ -アミノ酪酸残基を有するピロールイミダゾールポリアミドは、例えば、Fmocでアミノ基を保護したアミノピロールカルボン酸類と、Fmocでアミノ基を保護したアミノイミダゾールカルボン酸類と、Fmocでアミノ基を保護した $\beta$ -アラニン又はFmocでアミノ基を保護した $\gamma$ -アミノ酪酸を担持した固相担体を用い、ペプチド合成機を使用して固相Fmoc法による自動合成法により合成することが出来る。

アミノピロールカルボン酸類の具体例としては、例えば、4-アミノ-2-ピロールカルボン酸、4-アミノ-1-メチル-2-ピロールカルボン酸、4-アミノ-1-エチル-2-ピロールカルボン酸、4-アミノ-1-プロピル-2-ピロールカルボン酸、4-アミノ-1-ブチル-2-ピロールカルボン酸等が挙げられ、アミノイミダゾールカルボン酸類の具体例としては、例えば、4-アミノ-2-イミダゾールカルボン酸、4-アミノ-1-メチル-2-イミダゾールカルボン酸、4-アミノ-1-エチル-2-イミダゾールカルボン酸、4-アミノ-1-プロピル-2-イミダゾールカルボン酸、4-アミノ-1-ブチル-2-イミダゾールカルボン酸等が挙げられる。

Fmocでアミノ基を保護したアミノピロールカルボン酸類及びFmocでアミノ基を保護したアミノイミダゾールカルボン酸類の合成法をN-メチルピロール又はN-メチルイミダゾールを出発原料として用いた場合を例にして反応スキームで示すと以下の如くなる。なお、参考までに、Fmocでアミノ基を保護した $\gamma$ -アミノ酪酸の合成法の反応スキームも以下に併せて示す。



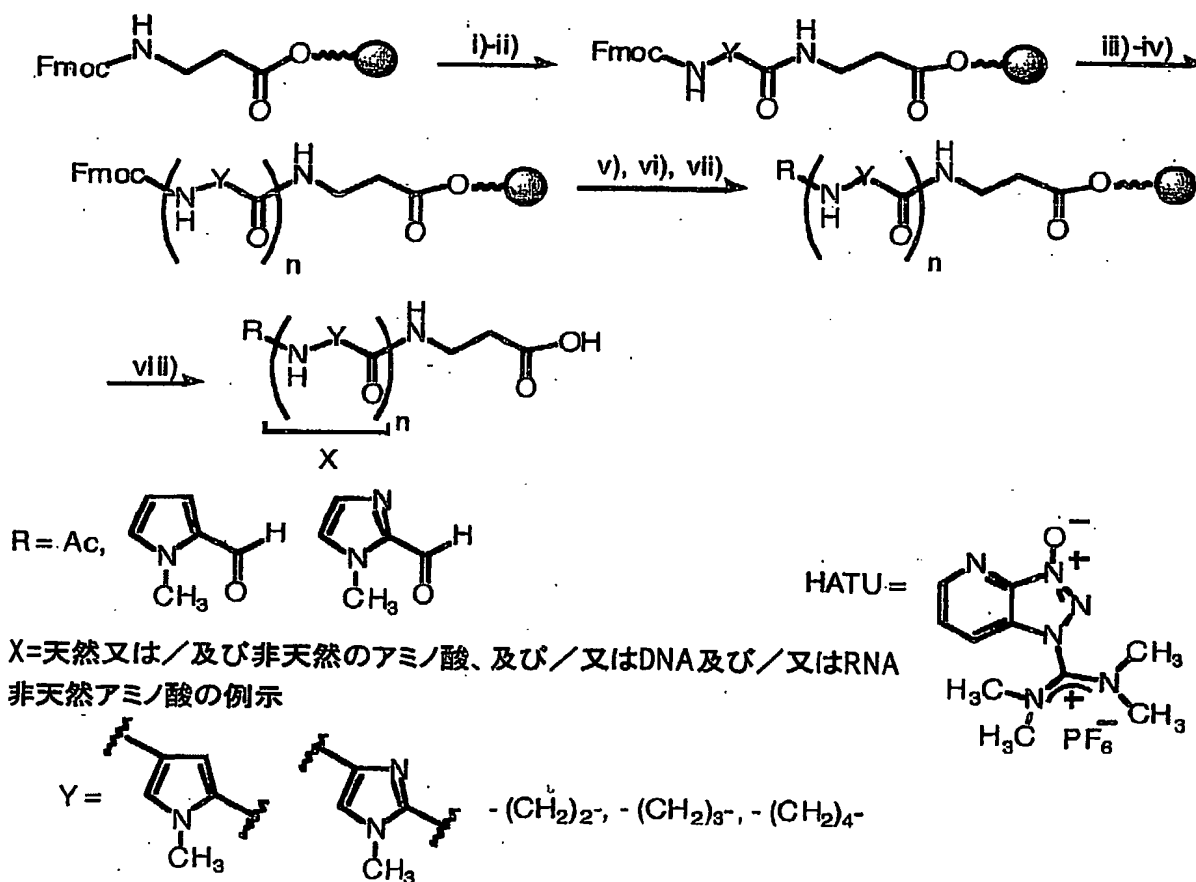


なお、上記合成法の詳細については後記実施例の記載参照。

本発明におけるペプチド合成機での固相合成法は、通常、HATU・[O-(7-アゾベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート]/DIEA (N, N-ジイソプロピルエチルアミン) 系で行われる。

ペプチド合成機としては、例えば、Continuous Flow法を採用したApplied Biosystems社のペプチド合成機Pioneer等が用いられる。

本発明に係るピロール-イミダゾールポリアミドの固相合成法を反応スキームで示すと以下の如くなる。



i) 20%ピペリジン/DMF溶液、ii)モノマーユニット、HATU/DIEA  
iii) 20%ピペリジン/DMF溶液、iv)モノマーユニット、HATU/DIEA  
v) 20%ピペリジン/DMF溶液、vi) 5%無水酢酸、5%ピリジン/DMF液  
vii)取り出し、減圧乾燥、viii) 95% TFA (トリフルオロ酢酸)、2.5% TIS (トリイソプロピルシラン)、2.5%水。

なお、上記合成法の詳細については後記実施例の記載参照。

本発明の方法によれば末端をカルボン酸残基として固相担体から切り出すことが可能なため、様々な官能基をピロールーイミダゾールポリアミドに導入することが可能であるが、例えばDNAアルキル化剤を導入する場合を例にして記すと以下の如くなる。

即ち、固相担体から切り出したカルボン酸末端に対して、例えば、DNAアルキル化剤のDu86 (2-メチル-3-メトキシカルボニル-A環ピロール-DUMA) の活性中心であるA環部 (Du86) を導入する場合、先ず、カルボン酸末端を有するピロールーイミダゾールポリアミドを例えばDMF等の溶媒に溶解し、この溶液に室温下、カルボニルジイミダゾール (CDI) を加え、同温で一晩攪拌した後、溶媒を減圧下留去し、残査をジエチルエーテル等で適宜洗浄し、イミダゾールエステル体を得る。

Du86をDMF等の溶媒に溶解し、この溶液に冷却下 (例えば-15℃)、水素化ナトリウムを加え、30分程度攪拌した後、この溶液に、上で得られたイミダゾールエステルのDMF溶液を滴下し、同温度で一晩攪拌する。これにリン酸ナトリウムバッファー (pH 6.86) 等を加えてpHを調整した後、減圧下溶媒を留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー及びHPLC等による精製を行ない、カップリング体 (DNAアルキル化剤を導入したピロールーイミダゾールポリアミド) を得る。

かくして得られた、DNAアルキル化剤を導入したピロールーイミダゾールポリアミドを用いることにより、配列特異的DNAアルキル化が可能となる。

なお、上記合成法の詳細については後記実施例の記載参照。

FITC (フルオレセインイソチオシアネート) は古くから抗体の蛍光標識試薬として知られている。今回本発明者らが開発したFmoc法によるピロールー

イミダゾールポリアミド合成の発展として、FITCをピロールイミダゾールポリアミドに導入してコンジュゲートを合成することも可能である。得られてくるコンジュゲートは、特定のDNA配列を認識出来る蛍光標識試薬として用いることが出来、がんを含めた遺伝病に関係するDNA配列を容易に識別出来る。これは、ピロールイミダゾールポリアミドを用いた治療を行なう前段階に利用出来るだけでなく、診断薬としての利用も可能である。

合成は先に示したピロールイミダゾールポリアミドの固相合成法と同じ手法、即ち、Continuous Flow法を採用したApplied Biosystemsのペプチド合成機Pioneer等を用いて固相Fmoc法による自動合成法により合成することが出来る。

なお、上記合成法の詳細については後記実施例の記載参照。

### 実施例

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

#### 実施例1 モノマーユニットの合成（上記〔化1〕の反応スキーム参照）

固相合成に用いるモノマーユニット11、12及び14は次に示した方法により合成した。また、 $\beta$ -アラニンのFmoc保護体は市販されているものを用いた。

なお、反応及び精製に用いた試薬、溶媒は市販のものを用いた。<sup>1</sup>H-NMRは日本電子JNM-A500を使用した。

試薬の略号は以下のように用いた。ジメチルホルムアミド（DMF）、ジイソプロピルエチルアミン（DIEA）、トリイソプロピルシラン（TIS）、トリフルオロ酢酸（TFA）、カルボニルジイミダゾール（CDI）、4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）。

#### （1）1-メチル-2-トリクロロアセチルピロール(3)の合成

トリクロロアセチルクロリド（200.0 g, 1.10 mol）の塩化メチレン（600 ml）溶液中に1（90.3 g, 1.10 mol）の塩化メチレン（200 ml）溶液を3時間かけて滴下した。この際に、窒素ガスを溶液中に噴霧し、反応の際に発生する塩

化水素を除去した。一晚攪拌した後、溶媒を減圧下留去した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル-ヘキサン(1:10, v/v)溶出部よりトリクロロアセチル体 3 (189.7 g, 76%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.95 (3H, s), 6.20 (1H, s), 6.95 (1H, s), 7.48 (1H, s);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 38.5, 96.3, 108.9, 121.8, 124.0, 133.6, 172.9; IR (KBr)  $\nu$ : 1657, 1404, 1363, 1334, 1102, 1069, 845, 808, 745, 690  $\text{cm}^{-1}$ 。

(2) 1-メチル-4-ニトロ-2-トリクロロアセチルピロール(5)の合成

3 (45.2 g, 0.200 mol)の無水酢酸(200 ml)溶液を-40℃に冷却し、同温下発煙硝酸(18.5 ml, 0.360 mol)を滴下した。室温で2時間攪拌した後、イソプロパノールを加え、析出した固体をろ取り、ニトロ体 5 (27.2 g)を得た。更にろ液を減圧下留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル-ヘキサン(1:10, v/v)溶出部より更に 5 (10.7 g)を得た。(総収率70%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.06 (3H, s), 7.72 (1H, s), 7.93 (1H, s);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 39.7, 94.8, 117.5, 121.4, 130.2, 135.3, 173.6; IR (KBr)  $\nu$ : 1698, 1406, 1325, 1226, 1185, 1112, 998, 857, 810, 752, 716, 683  $\text{cm}^{-1}$ 。

(3) 1-メチル-4-ニトロ-2-トリクロロアセチルイミダゾール(6)の合成

トリクロロアセチルクロリド(36.3 g, 0.20 mol)の塩化メチレン(120 ml)溶液中に 2 (16.4 g, 0.20 mol)の塩化メチレン(80 ml)溶液を2時間かけて滴下した。4時間攪拌した後、氷冷下トリエチルアミン(20.2 g, 0.20 mol)を滴下した。溶媒を減圧下留去した後、残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、酢酸エチル-ヘキサン(1:1, v/v)溶出部よりトリクロロアセチル体 4 (23.2 g, 51%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.03 (3H, s), 7.14 (1H, s), 7.32 (1H, s);  
 $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 37.1, 94.8, 128.5, 130.5, 136.1,  
172.3; IR (KBr)  $\nu$ : 1657, 1518, 1466, 1408, 1352,  
1313, 1278, 810, 779  $\text{cm}^{-1}$ .

無水酢酸(200 ml)溶液を氷冷し、同温下発煙硝酸(18.5 ml, 0.360 mol)を滴下した。更に同温下で濃硫酸(0.5 ml)を加え、同温で4 (34.0 g, 0.150 mol)を少量づつ2時間かけて加えた後、室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下留去し、得られた残渣をクロロホルムで洗浄して6 (16.0 g)を得た。同様の操作を二度繰り返して更に6 (8.6 g)を得た。(総収率60%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.10 (3H, s), 7.90 (1H, s);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :  
38.2, 93.5, 126.0, 133.6, 145.8, 172.8; IR (KBr)  $\nu$ : 1709, 1541, 1514, 1491, 1464, 1344, 1317,  
1135, 1023, 1000, 816, 743, 638  $\text{cm}^{-1}$ .

(4) メチル 4-ニトロ-1-メチルピロール-2-カルボン酸エステル(7)の合成

5 (32.4 g, 0.12 mol)のメタノール(140 ml)溶液中にDMAP (0.50 g, 4.55 mmol)を加えた、40分攪拌した。その後沈殿をろ別し、メタノールで洗浄し7 (18.9 g)を得た。ろ液は溶媒を減圧下留去した後、同様の操作を繰り返し、更に7 (2.3 g)を得た。(総収率97%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.84 (3H, s), 3.97 (3H, s), 7.39 (1H, d,  $J=$   
2.0 Hz), 7.57 (1H, d,  $J=2.0$  Hz); IR (KBr)  $\nu$ : 1711, 1541,  
1510, 1425, 1315, 1257, 1195, 1118, 1089,  
752  $\text{cm}^{-1}$ .

(5) メチル 4-ニトロ-1-メチルイミダゾール-2-カルボン酸エステル(8)の合成

6 (70.0 g, 256 mmol)のメタノール(500 ml)溶液中にDMAP (0.500 g, 4.55 mmol)を加えた後、2時間攪拌した。その後沈殿をろ別し、ジエチルエーテルで洗浄し8を得た。ろ液は減圧下留去した後、同様の操作を2回繰

り返し、8 (46.0 g, 97%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.96 (3H, s), 4.10 (3H, s), 7.82 (1H, s);  
 $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 37.0, 52.8, 124.2, 134.6, 145.8,  
158.4; IR (KBr)  $\nu$ : 1729, 1643, 1497, 1460, 1377,  
1350, 1313, 1265, 1147, 1129, 998, 845, 814,  
656  $\text{cm}^{-1}$ 。

(6) 1-メチル-4-アミノピロール-2-カルボン酸メチルエステル塩酸塩 (9)の合成

7 (15.3 g, 83.0 mmol)をメタノールとジクロロメタン(150 ml, 1:2, v/v)混合溶媒に溶解し、10%パラジウム炭素(3 g)を加え懸濁させ、水素雰囲気下で2日間攪拌した。その後、セライトに通してろ過してパラジウム炭素を除去し、ろ液に10%塩酸を加えた。生じた沈殿をろ別し、9 (4.71 g)を得た。更にろ液を減圧下留去した後、酢酸エチル-メタノールで再結晶を行い9 (6.86 g)を得た。(総収量 11.6 g, 73%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 3.74 (3H, s), 3.85 (3H, s), 6.80 (1H, s), 7.25 (1H, s), 10.07 (3H, br); ESI MS:  $m/e$  calcd for  $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$  ( $\text{M-HCl} + \text{H}$ ) 154.1, found 154.1。

(7) 1-メチル-4-アミノイミダゾール-2-カルボン酸メチルエステル塩酸塩 (10)の合成

8 (20.0 g, 108 mmol)のジクロロメタン(300 ml)溶液に10%パラジウム炭素(5 g)を加え懸濁させ、水素雰囲気下で1日間攪拌した。その後セライトに通してろ過してパラジウム炭素を除去し、ろ液に10%塩酸を加え酸性にした。沈殿物をろ取し、10 (19.8 g, 96%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 3.83 (3H, s), 3.93 (3H, s), 7.37 (1H, s), 9.96 (3H, br.s); ESI MS:  $m/e$  calcd for  $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$  ( $\text{M-HCl} + \text{H}$ ) 156.1, found 156.1。

(8) 4-[(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノ]-1-メチル-2-ピロール  
カルボン酸 (11)の合成

9 (10.9 g, 57.2 mmol)を蒸留水(80 ml)に溶解させ、水酸化ナトリウム  
(9.2 g)を加えた。一晚攪拌した後、1 N 塩酸で中和し、減圧下留去した。残渣  
を水とエチレングリコールジメチルエーテルの混合溶媒(100 ml, 1:1, v/v)  
に溶解し、次の反応に用いた。この溶液に、炭酸ナトリウム(5.3 g)を溶解させ  
た後、9-フルオレニルメチルクロロホーマート(17.8 g, 68.6 mmol)を加えた。  
一晚攪拌した後、沈殿をろ別し、11 (12.3 g, 34.1 mmol)を得た。更にろ  
液を1 M炭酸ナトリウム水溶液とジエチルエーテルの混合溶液(1:1, v/v)に加え  
た。沈殿はろ別し、更に11 (3.4 g)を得た。水層は10%塩酸で酸性にした後、  
酢酸エチルで抽出した。その有機層を減圧下留去し、ヘキサノジオキサンで再  
結晶し、11 (1.6 g)を得た。(総収量 17.3 g, 84%)

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 3.77 (3H, s), 4.27 (1H, t,  $J=6.0$  Hz), 4.  
43 (2H, d,  $J=6.0$  Hz), 6.60 (1H, s), 7.02 (1H, s), 7.32  
(2H, t,  $J=7.5$  Hz), 7.41 (2H, t,  $J=7.5$  Hz), 7.70 (2H, d,  $J=7.$   
5 Hz), 7.89 (2H, d,  $J=7.5$  Hz), 9.40 (1H, s);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  
 $\delta$ : 36.1, 46.7, 65.4, 107.6, 118.8, 119.9, 120.  
1, 122.4, 125.0, 127.1, 127.6, 140.8, 143.8,  
153.3, 161.8。

(9) 4-[(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノ]-1-メチル-2-イミダゾ  
ールカルボン酸 (12)の合成

10 (8.24 g, 41.9 mmol)を蒸留水(60 ml)に溶解させ、水酸化ナトリウム  
(4.2 g)を加えた。一晚攪拌した後、1 N 塩酸で中和し、減圧下留去した。残渣  
を水とエチレングリコールジメチルエーテルの混合溶媒(200 ml, 1:1, v/v)  
に溶解し、次の反応に用いた。この溶液に、炭酸水素ナトリウム(14.1 g)を溶  
解させた後、9-フルオレニルメチルスクシンイミジルカルボナート(16.9 g,  
50.1 mmol)を加えた。一晚攪拌した後、沈殿をろ別し、12 (10.8 g, 29.  
7 mmol)を得た。更にろ液を10%塩酸で酸性にした後、生じた沈殿をろ別し、そ

の沈殿を酢酸エチルで洗浄して 12 (1.2 g, 3.30 mmol)を得た。(総収量 12.0 g, 79%)

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 3.87 (3H, s), 4.27 (1H, t,  $J=6.0$  Hz), 4.51 (2H, d,  $J=6.0$  Hz), 6.80 (1H, s), 7.32 (2H, t,  $J=7.5$  Hz), 7.41 (2H, t,  $J=7.5$  Hz), 7.70 (2H, d,  $J=7.5$  Hz), 7.89 (2H, d,  $J=7.5$  Hz), 9.50 (1H, s);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 35.4, 46.5, 66.1, 113.4, 120.1, 125.4, 127.1, 127.7, 132.04, 137.4, 140.7, 143.7, 153.3, 159.9; MSスペクトルはメチルエステルに変換して測定した。HRMS (EI+):  $m/e$  calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$  (M) as methyl ester 377.1376, found 377.1380.

(10) 4-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)アミノ酪酸 (14)の合成

13 (5.0 g, 48.5 mmol)を、水とエチレングリコールジメチルエーテルの混合溶媒(200 ml, 1:1, v/v)に溶解させた後、9-フルオレニルメチルスクシンイミジルカルボナート(16.4 g, 48.6 mmol)を加えた。更に炭酸ナトリウム(10 g, 94.4 mmol)を加え、一晚攪拌した。生じた沈殿をろ別し、14 (10.3 g)を得た。更にろ液を1N塩酸で酸性にした後、生じた沈殿をろ別し、14 (4.4 g)を得た。(総収量 14.7 g, 94%)

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1.61 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 2.19 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 2.98 (2H, dd,  $J=13.0, 6.0$  Hz), 4.20 (1H, t,  $J=6.5$  Hz), 4.28 (2H, d,  $J=6.5$  Hz), 7.32 (2H, t,  $J=7.5$  Hz), 7.40 (2H, t,  $J=7.5$  Hz), 7.67 (2H, d,  $J=7.5$  Hz), 7.87 (2H, d,  $J=7.5$  Hz), 11.0 (1H, br.s); MSスペクトルはメチルエステルに変換して測定した。HRMS (EI+):  $m/e$  calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_4$  as methyl ester 339.1471, found 339.1475.

実施例2 ピロロールイミダゾールポリアミドの固相合成(上記[化2]の反応スキーム参照)



実施例 1 で得られた化合物 1 1, 1 2, 1 4 並びに市販品の  $\beta$ -アラニン Fmoc 保護体を用いて、各種ピロール-イミダゾールポリアミドの合成を行った。

合成プロトコルを表 1 に示す。

表 1

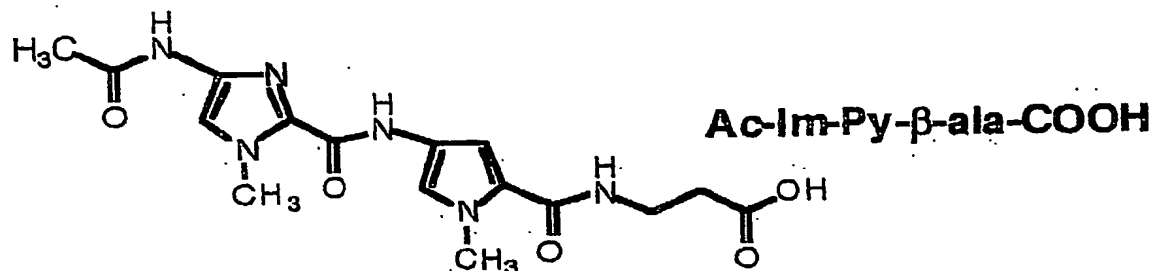
	合成ステップ	時間
1, 脱保護	20%ピペリジン/DMF	5 分
2, 洗浄	メタノール	50 秒
3, 縮合	HATU/DIEA	60 分
4, 洗浄	メタノール	40 秒
5, 保護	無水酢酸/ピリジン	10 分
6, 切出	95%TFA, 2.5% TIS, 2.5% 水	30 分

固相合成はContinuous Flow法を採用したApplied Biosystems社のペプチド合成機Pioneerを用いて行った。固相担体はFmoc- $\beta$ -アラニンがプレロードされた市販のWang resinを用いた。また、HATU、DIEA及びモノマーユニットは、固相担体の活性末端に対して4当量用いた。合成前に固相担体をDMFに30分膨潤させた後、Pioneerの合成カラムに詰めた。合成はまず、担体にプレロードされている $\beta$ -アラニンのFmoc基を、20%ピペリジンのDMF溶液で5分間処理することにより脱保護した。その後、担体をメタノールで50秒間洗浄し、導入したいモノマーユニット、HATU及びDIEAをカラムに通し、60分間サイクルさせた後、メタノールで再度40秒間洗浄した。この脱保護、伸長というサイクルを一サイクルとして、モノマーユニットを目的とするポリアミドの配列通りに順に縮合させた。その後、脱保護を同様に行った後、5%無水酢酸、5%ピリジンのDMF溶液でアセチル化を行った。反応終了後、固相担体をカラムから取り出し、減圧乾燥を行った後、50mlのナスフラスコ中に移し、95%TFA、2.5%TIS、2.5%水を5ml加えて30分間攪拌し、担体から切り出しを行った。精製は0.1%TFA水溶液とアセトニトリルを用いたHPLCにより行った。

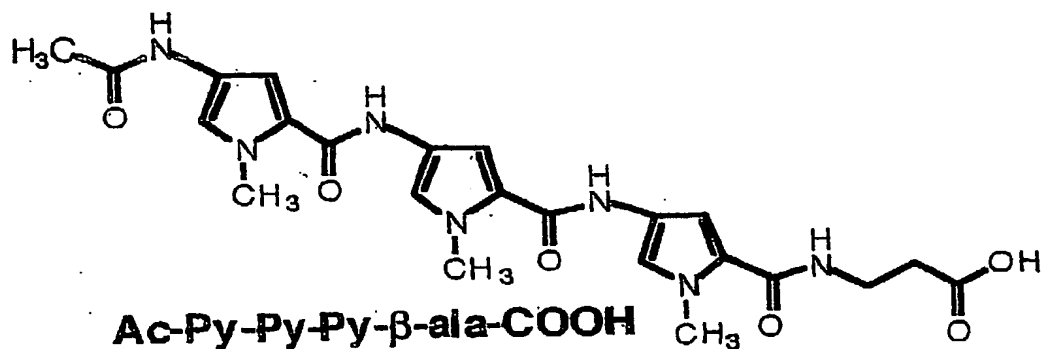
得られたピロール-イミダゾールポリアミドの構造式と収率及び各種スペクトルデータ等を以下に示す。

なお、以下の記載において、Im は1-メチル-4-アミノイミダゾール-2-カルボン酸残基を、Py は1-メチル-4-アミノピロール-2-カルボン酸残基を、Ac は

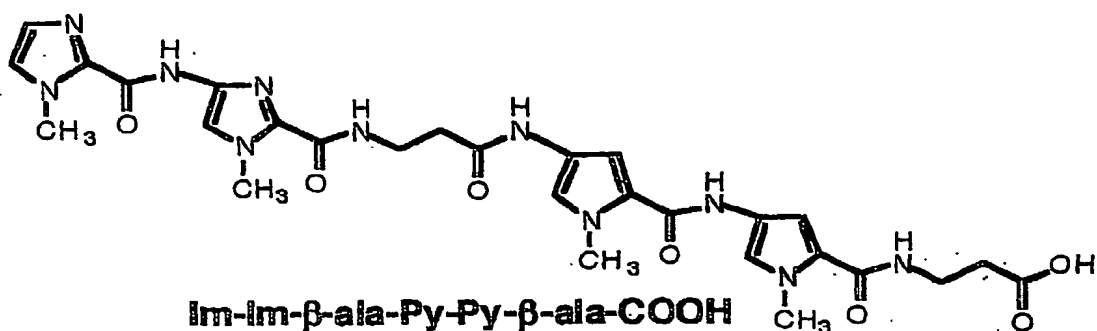
アセチル基を、 $\gamma$ -butyl は  $\gamma$ -アミノ酪酸残基を、 $\beta$ -ala-COOH は  $\beta$ -アラニンをそれぞれ表す。



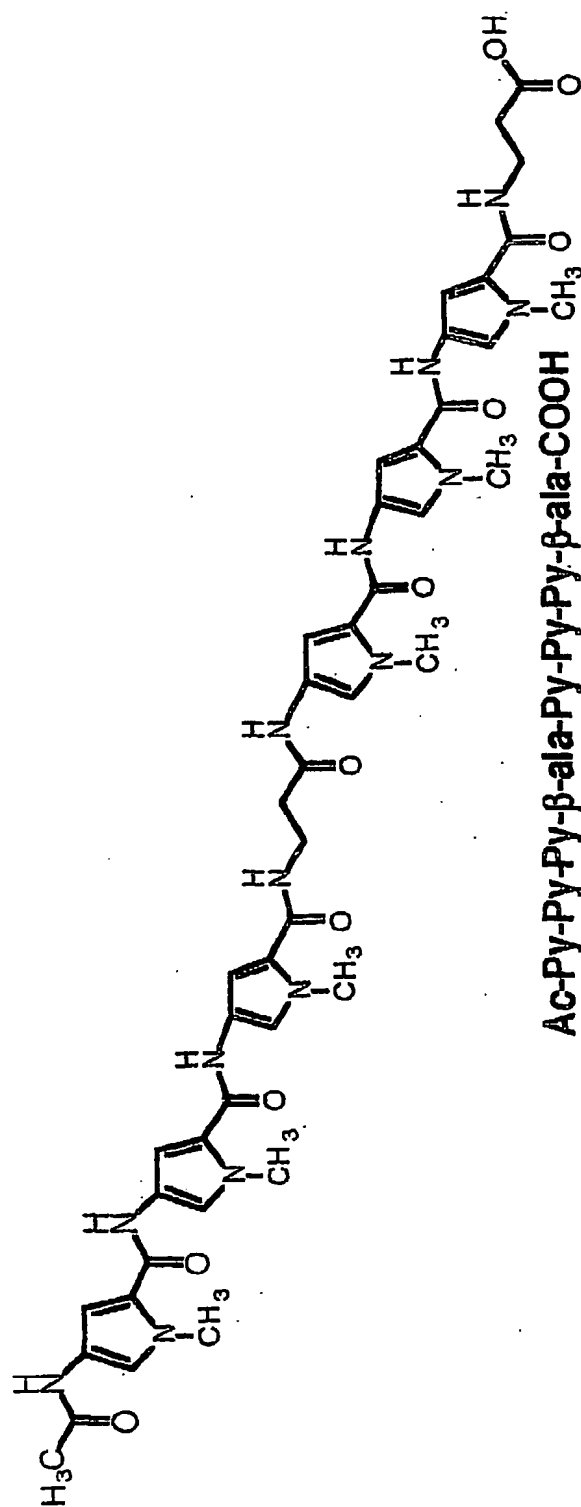
Ac-Im-Py- $\beta$ -ala-COOH : 収率 19% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 2.15 (3H, s), 2.63 (2H, t,  $J=6.5$  Hz), 3.60 (2H, t,  $J=6.5$  Hz), 3.90 (3H, s), 4.04 (3H, s), 6.71 (1H, d,  $J=1.5$  Hz), 7.24 (1H, d,  $J=1.5$  Hz), 7.35 (1H, s), 4つのプロトン (3 NHs and 1 COOH) は  $\text{CD}_3\text{OD}$  に変えたことにより検出されなかった。 ; ESI MS  $m/e$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{N}_6$  (M+H) 377.2, found 377.2.



Ac-Py-Py-Py- $\beta$ -ala-COOH : 収率 18% ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 2.07 (3H, s), 2.60 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 3.55 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 3.87 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.90 (3H, s), 6.76 (1H, s), 6.82 (1H, s), 6.91 (1H, s), 7.11 (3H, s), 7.18 (2H, s), 5つのプロトン (4 NHs and 1 COOH) は  $\text{CD}_3\text{OD}$  に変えたことにより検出されなかった。 ; ESI MS  $m/e$  calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{O}_5\text{N}_7$  (M+H) 498.2, found 498.3.

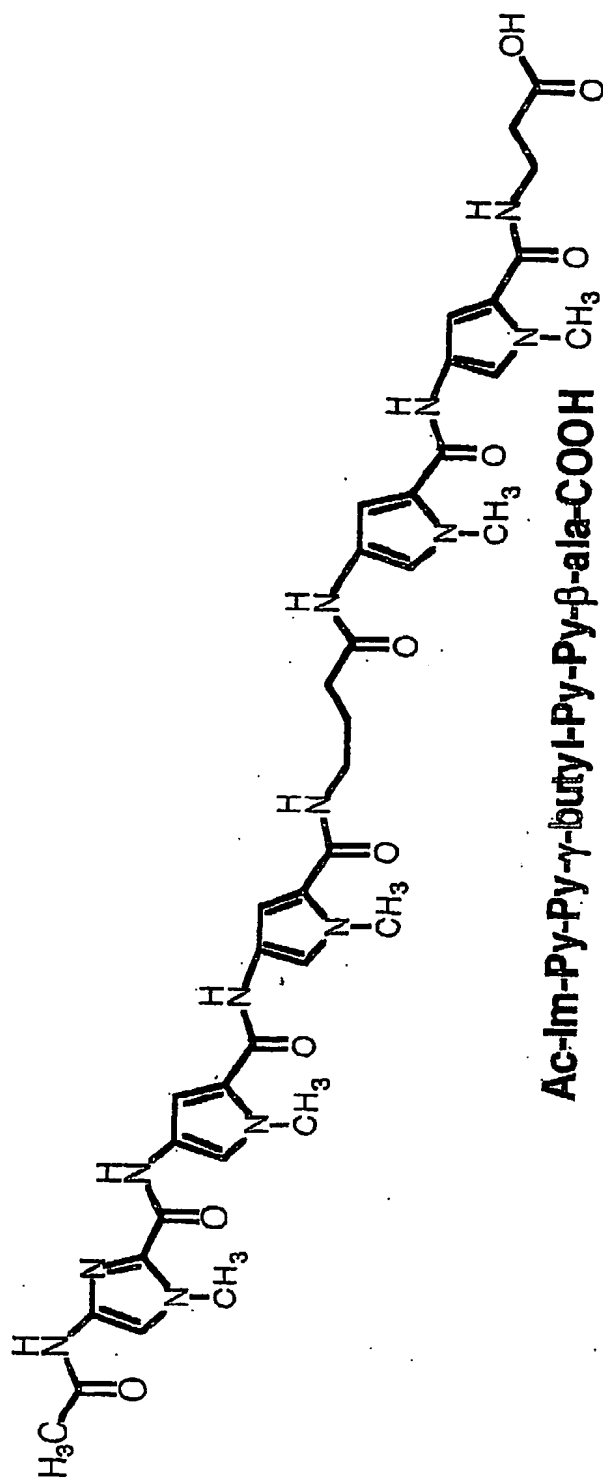


Im-Im-β-ala-Py-Py-β-ala-COOH : 収率 31% ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 2.59 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 2.62 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 3.54 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 3.67 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 3.83 (3H, s), 3.86 (3H, s), 4.01 (3H, s), 4.11 (3H, s), 6.74 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 6.79 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.13 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.14 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.51 (1H, s), 7.54 (1H, s), 7.62 (1H, s), 6つのプロトン(5  $\text{NHs}$  and 1  $\text{COOH}$ ) は $\text{CD}_3\text{OD}$  に変えたことにより検出されなかった。 ; ESI MS  $m/e$  calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_7\text{N}_{11}$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) 636.3, found 636.3.

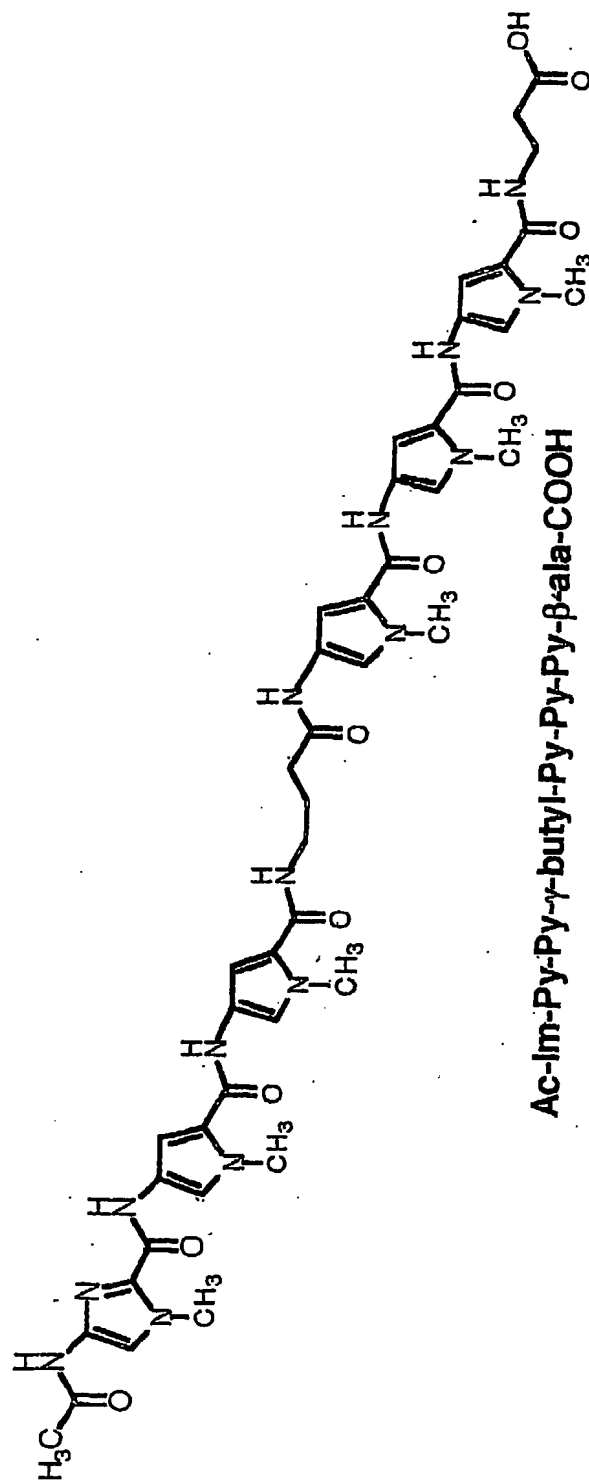


Ac-Py-Py-β-ala-Py-Py-β-ala-COOH

Ac-Py-Py-Py- $\beta$ -ala-Py-Py-Py- $\beta$ -ala-COOH : 収率 18% ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 2.06 (3H, s), 2.59 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 2.62 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 3.55 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 3.63 (2H, t,  $J=7.0$  Hz), 3.85 (3H, s), 3.86 (6H, s), 3.87 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.89 (3H, s), 6.75 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 6.76 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 6.81 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 6.83 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 6.88 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 6.89 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.11 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.14-7.16 (4H, m), 7.17 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 9つのプロトン (8  $\text{NHs}$  and 1  $\text{COOH}$ ) は  $\text{CD}_3\text{OD}$  に変えたことにより検出されなかった。 ; ESI MS  $m/e$  calcd for  $\text{C}_{44}\text{H}_{61}\text{O}_{10}\text{N}_{14}$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) 935.4, found 935.4。



Ac-I $\alpha$ -Py-Py- $\gamma$ -butyl-Py-Py- $\beta$ -ala-COOH : 収率 18% ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  :  
1.78 (2H, t,  $J=7.5$  Hz), 2.01 (3H, s), 2.27 (2H, t,  $J=7.5$  Hz),  
3.21 (2H, dd,  $J=7.5, 12.5$  Hz), 3.79 (3H, s), 3.80 (3H, s),  
3.82 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.94 (3H, s), 6.  
84 (1H, d,  $J=1.5$ ), 6.86 (1H, d,  $J=1.5$ ), 6.89 (1H, d,  $J=1.$   
5), 7.02 (1H, d,  $J=1.5$ ), 7.12 (1H, d,  $J=1.5$ ), 7.16-7.1  
7 (3H, m), 7.22 (1H, d,  $J=1.5$ ), 7.26 (1H, d,  $J=1.5$ ), 7.41  
(1H, s), 7.99 (1H, t,  $J=6.5$ ), 8.03 (1H, t,  $J=6.5$ ), 9.81  
(1H, s), 9.87 (1H, s), 9.88 (2H, s), 9.93 (1H, s), 10.21  
(1H, s), 3つのプロトン (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO, and COOH)は検出されなかった。  
(重なったため); ESI MS  $m/e$  calcd for C<sub>38</sub>H<sub>48</sub>O<sub>13</sub>N<sub>9</sub> (M+H) 828.3, found  
828.3。

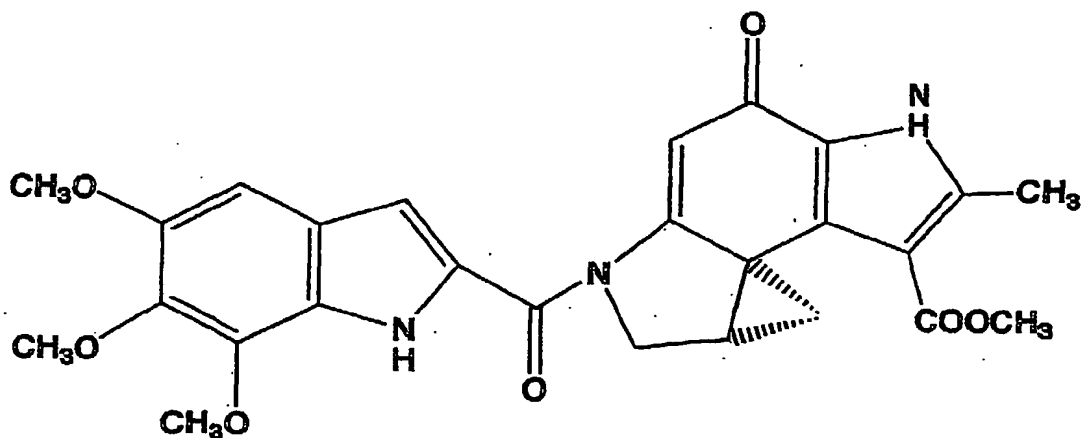




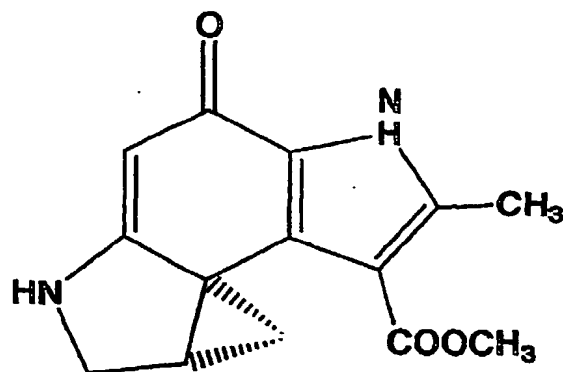
Ac-Im-Py-Py- $\gamma$ -butyl-Py-Py-Py- $\beta$ -ala-COOH : 収率 10% ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  : 1.78 (2H, t,  $J=7.5$  Hz), 2.01 (3H, s), 2.27 (2H, t,  $J=7.5$  Hz), 3.21 (2H, dd,  $J=12.5$ , 7.5 Hz), 3.79 (3H, s), 3.80 (6H, s), 3.82 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.94 (3H, s), 6.84 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 6.86 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 6.89 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.02 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.12 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.16-7.17 (2H, m), 7.22 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.26 (1H, d,  $J=2.0$  Hz), 7.99 (1H, t,  $J=6.0$  Hz), 8.03 (1H, t,  $J=6.0$  Hz), 9.81 (1H, s), 9.87 (2H, s), 9.88 (2H, s), 9.93 (1H, s), 10.21 (1H, s), 4つのプロトン(N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO)はDMSO溶媒のピークの一つがオーバーラップするため確認できない。; ESI MS  $m/e$  calcd for C<sub>44</sub>H<sub>53</sub>O<sub>10</sub>N<sub>15</sub> (M+H) 950.4, found 950.3.

実施例3 ピロール-イミダゾールポリアミドのカルボン酸末端へのDNAアルキル化剤の導入

DNAアルキル化剤であるDU-86の構造式及びDU-86の活性中心であるA環部(DU86)の構造式を以下に示す。



2-メチル-3-メトキシカルボニル-A環ピロール-DUMA (DU-86)



Du86 (15)

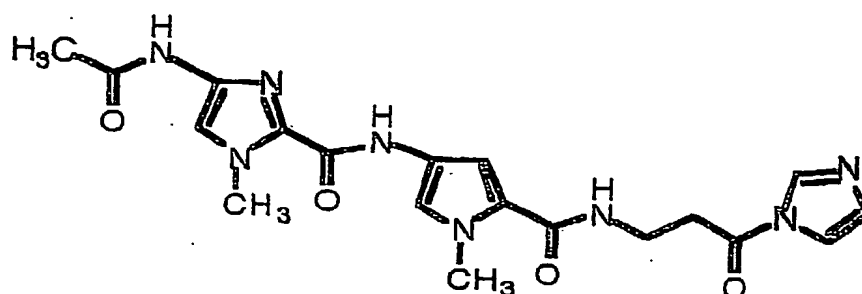
固相担体から切り出したカルボン酸末端に対して、DNAアルキル化剤であるDU-86の活性中心であるA環部(Du86) 15を導入した。操作手順は以下の通りである。

実施例2で得られた、カルボン酸末端を有するピロール-イミダゾールポリアミド(0.05 mmol)のDMF(1.5 mL)溶液に室温下、カルボニルジイミダゾール(CDI、24.3 mg, 0.15 mmol)を加え、同温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下留去し、残渣をジエチルエーテルで2回洗浄し、イミダゾールエステル体(30-70%)を得た。

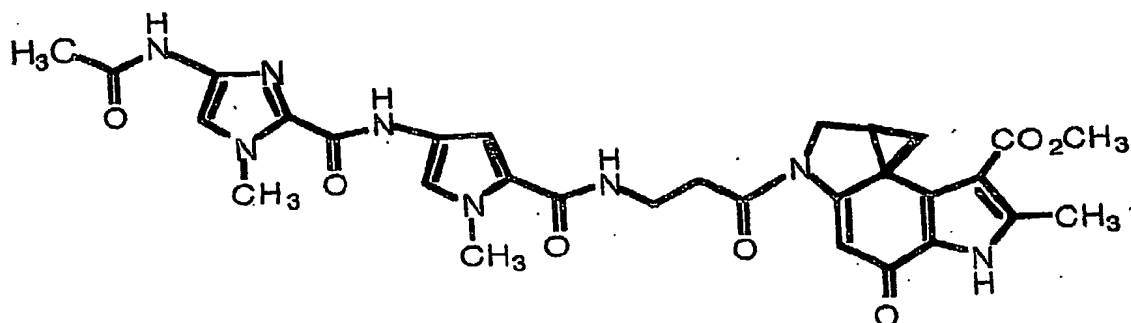
15 (6.2 mg, 0.024 mmol)のDMF(2 mL)溶液を-15℃に冷却し、60%水素化ナトリウム(2.0 mg, 0.05 mmol)を加え、同温下30分攪拌した。その溶液に、上で得られたイミダゾールエステル(0.024 mmol)のDMF(1.5 mL)溶液を滴下し、同温度で一晩攪拌した。リン酸ナトリウムバッファー(pH 6.86)を加えた後、減圧下溶媒を留去した。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、更に、HPLCによる精製を行ない、カップリング体(20-50%)を得た。

得られたイミダゾールエステル体及びカップリング体の構造式と得量、収率及び各種スペクトルデータ等を以下に示す。

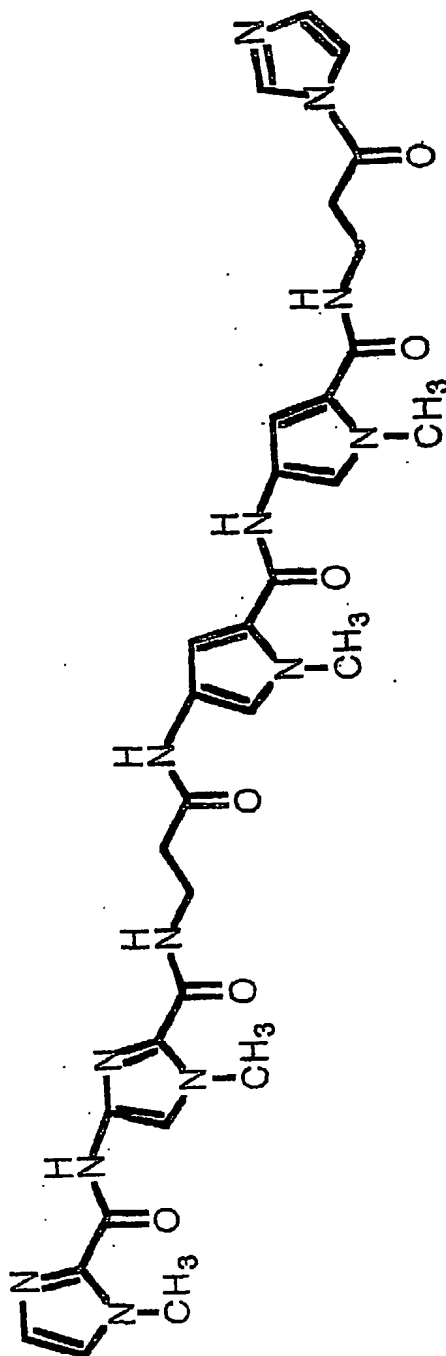
なお、以下の記載において、Im'はイミダゾリル基を表し、β-ala-COはβ-アラニン残基を表し、Ac, Im, Py及びγ-butylは前記と同じ。



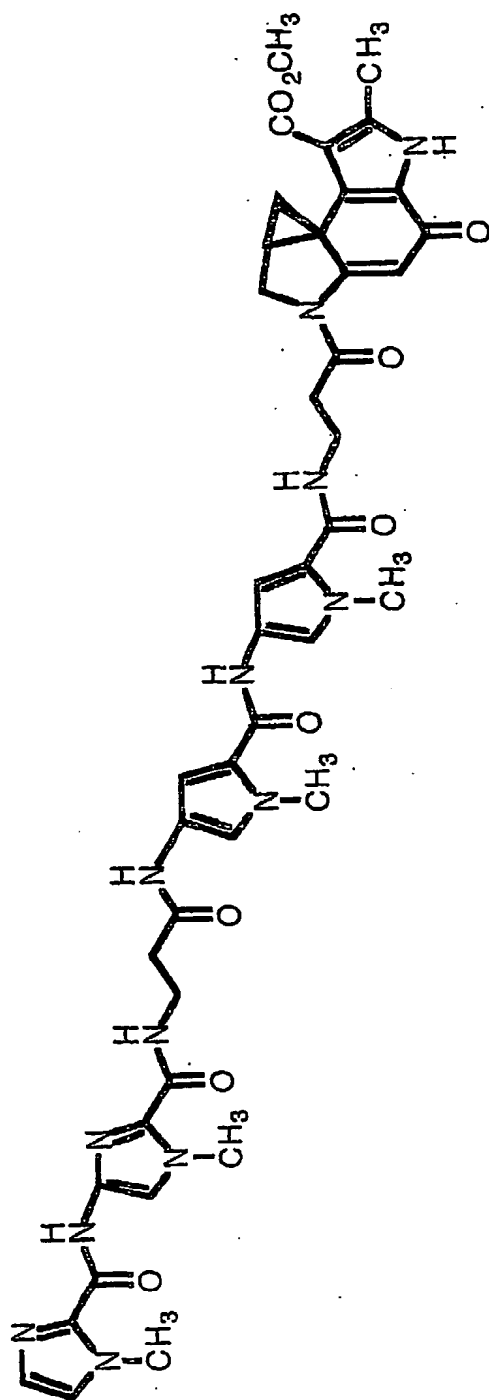
Ac-Im-Py-β-ala-CO-Im' : 5.6 mg (45%);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 2.01 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.92 (3H, s), 6.93 (1H, d,  $J=1.5$  Hz), 7.06 (1H, s), 7.21 (1H, d,  $J=1.5$  Hz), 7.40 (1H, s), 7.72 (1H, s), 8.14 (1H, t,  $J=5.5$  Hz), 8.42 (1H, s), 9.92 (1H, s), 10.23 (1H, s), 4つのプロトン ( $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}$ ) はDMSO溶媒のピークがオーバーラップするため確認できない。; ESI MS  $m/e$  calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{N}$  (M+H) 427.2, found 427.2.



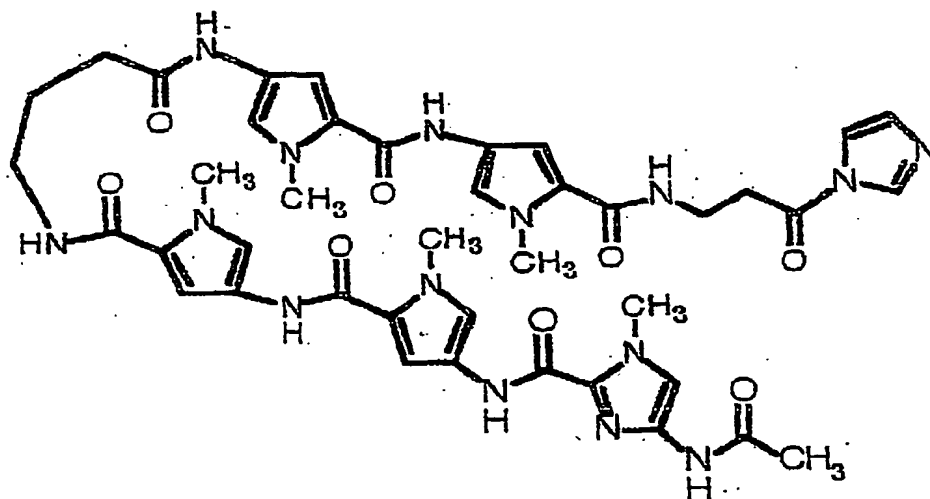
Ac-Im-Py-β-ala-CO-Du86 : 0.56 mg (9%);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 1.28 (1H, s), 2.01 (3H, s), 2.09 (1H, s), 2.45 (3H, s), 3.38-3.44 (2H, m), 3.70-3.75 (1H, m), 3.71 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.92 (3H, s), 4.08 (2H, s), 6.93 (2H, s), 7.22 (1H, s), 7.40 (1H, s), 8.03 (1H, t,  $J=5.5$  Hz), 9.89 (1H, s), 10.22 (1H, s), 12.35 (1H, s), 2つのプロトン ( $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}$ ) はDMSO溶媒のピークの一つがオーバーラップするため確認できない。; ESI MS  $m/e$  calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{O}_7\text{N}_3$  (M+H) 617.2, found 617.3.



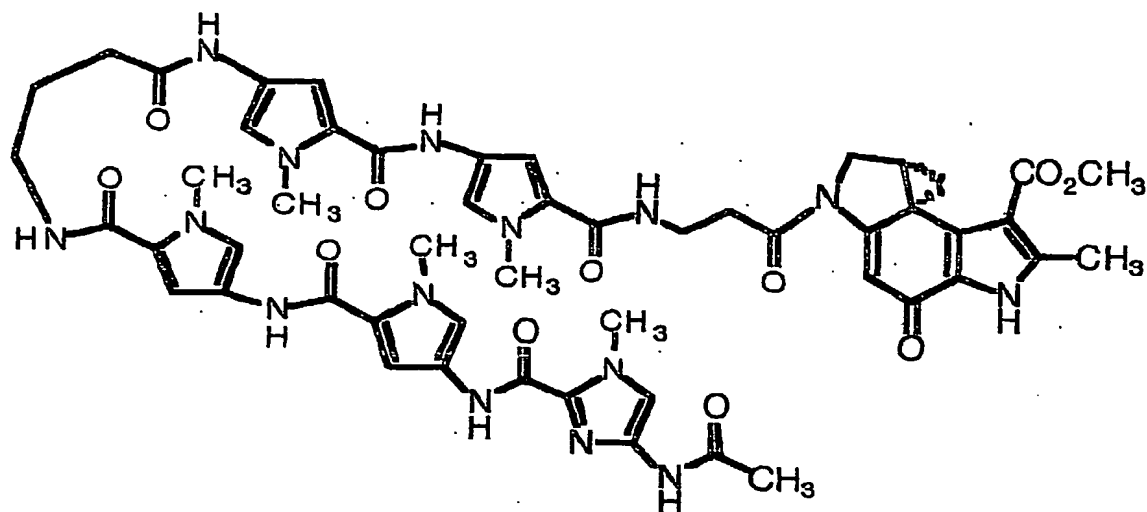
Im-Im- $\beta$ -ala-Py-Py- $\beta$ -ala-CO-Im' : 6.3 mg (7.4%);  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  
 $\delta$  : 3.49 (2H, q,  $J=6.5\text{ Hz}$ ), 3.53 (2H, q,  $J=6.5\text{ Hz}$ ), 3.78 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.96 (3H, s), 4.00 (3H, s), 6.83 (1H, s), 6.85 (1H, s), 7.05 (1H, s), 7.06 (1H, s), 7.15 (2H, s), 7.46 (1H, s), 7.71 (1H, s), 8.09 (1H, s), 8.23 (1H, s), 8.42 (1H, s), 8.61 (1H, s), 9.75 (1H, s), 9.84 (1H, s), 9.89 (1H, s), 4つのプロトン (2 of N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>s)はDMSO溶媒のピークの一つがオーバーラップするため確認できない。



Im-Im- $\beta$ -ala-Py-Py- $\beta$ -ala-CO-Du86 : 0.10 mg (3%);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  : 1.04-1.06 (1H, m), 2.08-2.12 (1H, m), 2.50 (3H, s), 2.58-2.66 (4H, m), 3.56 (2H, m), 3.67 (2H, m), 3.70-3.75 (1H, m), 3.77 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.87 (3H, s), 4.01 (3H, s), 4.02-4.05 (2H, m), 4.05 (3H, s), 6.74 (1H, s), 6.81 (1H, s), 7.05 (1H, s), 7.14 (2H, s), 7.25 (1H, s), 7.47 (1H, s), 7.88 (1H, s), 6つのプロトン (6 NHs) は  $\text{CD}_3\text{OD}$  に変えたことにより検出されなかった。; ESI MS  $m/e$  calcd for  $\text{C}_{42}\text{H}_{46}\text{O}_9\text{N}_{13}$  ( $\text{M}^+\text{H}$ ) 876.3, found 876.4.



Ac-Im-Py-Py- $\gamma$ -butyl-Py-Py- $\beta$ -ala-CO-Im' : 22.5 mg (68%);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  : 1.72-1.78 (2H, m), 2.01 (3H, s), 2.23-2.29 (2H, m), 3.50-3.56 (2H, m), 3.77 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.94 (3H, s), 6.82 (2H, s), 6.89 (1H, s), 7.03 (1H, s), 7.06 (1H, s), 7.12 (1H, s), 7.16 (1H, s), 7.26 (1H, s), 7.41 (1H, s), 7.68 (1H, s), 7.71 (1H, s), 8.00-8.04 (1H, m), 8.04-8.10 (1H, m), 8.42 (1H, s), 9.80 (1H, s), 9.82 (1H, s), 9.87 (1H, s), 9.93 (1H, s), 10.21 (1H, s), 4つのプロトン ( $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$  and  $\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{H}_2)$ ) は DMSO 溶媒のピークの一つがオーバーラップするため確認できない。



Ac-Im-Py-Py- $\gamma$ -butyl-Py-Py- $\beta$ -ala-CO-Du86 : 0.70 mg (HPLC精製後 7%) ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  : 1.04-1.06 (1H, m), 2.08-2.12 (1H, m), 2.58-2.66 (4H, m), 3.56 (2H, m), 3.67 (2H, m), 3.77 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.87 (3H, s), 4.01 (3H, s), 4.02-4.05 (2H, m), 4.05 (3H, s), 6.74 (1H, s), 6.81 (1H, s), 7.05 (1H, s), 7.14 (1H, s), 7.47 (1H, s), 7.88 (1H, s), 6つのプロトン ( $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2$  and  $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ) は $\text{CD}_3\text{OD}$ に変えたことにより検出されなかった。; ESI MS  $m/e$  calcd for  $\text{C}_{62}\text{H}_{58}\text{O}_{11}\text{N}_{15}$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) 1068.3, found 1068.4.

実施例4 DNAアルキル化剤を導入したピロール-イミダゾールポリアミドによる配列特異的DNAアルキル化

(1) 上で合成したAc-Im-Py- $\beta$ -ala-CO-Du86を用いてDNAアルキル化実験を行った。その結果を第1図に示す。

第1図から明らかなように、本化合物は、5'-TAAA-3'を認識して、3'-末端のアデニンをアルキル化していることが分かった。



(2) また同様の実験をIm-Im-β-ala-Py-Py-β-ala-CO-Du86を用いて行なった。その結果を第2図に示す。この場合、2つのイミダゾール部がDNA中のグアニンを認識し、配列特異的なDNAアルキル化が起こることが明らかとなった。即ち、本化合物は5'-GGAGAAA-3'を認識して、3'-末端のアデニンをアルキル化していることが明らかとなった。

これらの結果からも、本発明者らが開発したピロールイミダゾールポリアミドのFmoc法による自動合成法を用いることで、DNAを配列選択的にアルキル化する化合物が容易に得られることが明らかとなった。この技術により、がん細胞種特有のDNAをターゲットとする薬物の開発、即ち、副作用のない抗がん剤の開発の進展が大いに期待される。

(3) 次に、同様の実験をAc-Im-Py-Py-γ-butyl-Py-Py-β-ala-Du86を用いて行なった。この化合物は、ピロールイミダゾールポリアミド部位が自らヘアピン構造を取り、一分子でDNAの2本鎖の両側を認識できる。ヘアピン化合物はDNAに結合する際にPy-PyペアがATまたはTAをIm-PyペアがGCをPy-ImペアがCGを選択的に認識して結合するというダーバン則に従うことが知られているが、この化合物はβ-アラニンペア-Imという新たな分子認識の組み合わせを含んでいるので、新たな分子認識ルールの発見の可能性があり、DNAアルキル化実験を行なって確認した。その結果を第3図に示す(DNA: pUC18 III 70 nM、試薬濃度: 10 nM~500 nM, 5サンプル、反応条件: リン酸ナトリウム緩衝液(1.46 mM) 37℃, 8時間)。

第3図から明らかなように、この化合物の場合はヘアピン構造を取りながら一つの規則に従ってDNAをアルキル化していることが分かった。即ち、γ-butylヘアピンカーブ部位はATに、Py-PyペアがATまたはTAを認識し、Du86がAまたはGをアルキル化した。この際に、新たな分子認識ペアであるβ-アラニンペア-Imペアは、選択的にCGペアを認識し、配列特異的なアルキル化に重大な寄与をしていることが明らかとなった。この発見は今まで報告のない新たな発見である。

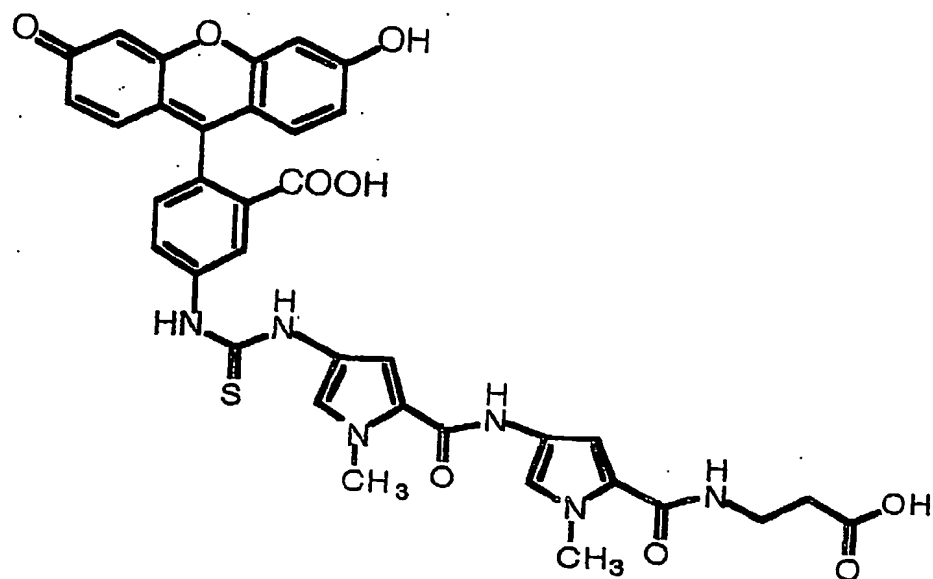
この結果、Ac-Im-Py-Py-γ-butyl-Py-Py-β-ala-Du86は5'-(A/T)(A/T)(A

/T)C(A/G)-3'部位を認識し、3'-末端のアデニンを選択的にアルキル化していると分かった。先にも述べたように、末端が $\beta$ -アラニンカルボン酸基を持つピロール-イミダゾールポリアミドの合成は本発明者らが今回発見したペプチド合成機を用いる手法により容易に調製できる。この発見により、本発明の合成手法は、新たなDNA認識性化合物の合成に寄与するところが極めて大なる発明であるということが明らかとなった。

#### 実施例5 FITC-ピロール-イミダゾールポリアミドコンジュゲートの固相合成

合成は先に示したピロール-イミダゾールポリアミドの固相合成法と同じ手法、即ち、Continuous Flow法を採用したApplied Biosystemsのペプチド合成機Pioneerを用いて行った。固相担体はFmoc- $\beta$ -アラニンがプレロードされた市販のWang resinを用いた。また、HATU、DIEA、FITC及びモノマーユニットは、固相担体の活性末端に対して4当量用いた。反応終了後、固相担体をカラムから取り出し、減圧乾燥を行った後、50 mlのナスフラスコ中に移し、95%TFA、2.5%TIS、2.5%水を5 ml加えて30分攪拌し、担体から切り出しを行った。精製は、0.1%TFA水溶液とアセトニトリルを用いたHPLCにより行った。

得られたFITC-ピロール-イミダゾールポリアミドコンジュゲートの構造式と収率及び各種スペクトルデータ等を以下に示す。



FITC-Py-Py- $\beta$ -ala-COOH : 収率 1.4% ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  : 3.79 (3H, s), 3.87 (3H, s), 6.54-6.62 (5H, m), 6.66 (1H, s), 6.67 (1H, s), 6.83 (1H, s), 6.97 (1H, s), 7.17 (1H, d,  $J=8.0$  Hz), 7.18 (1H, d,  $J=1.5$  Hz), 7.24 (1H, br. s), 7.82 (1H, dd,  $J=8.0, 1.5$  Hz), 7.80 (1H, t,  $J=6.0$  Hz), 8.21 (1H, s), 9.82 (1H, s), 9.85 (1H, s), 10.09 (2H, s), 12.20 (1H, br. s). 4つのプロトン(N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO)はDMSO溶媒のピークがオーバーラップするため確認できない。; ESI MS  $m/e$  calcd for C<sub>36</sub>H<sub>31</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>S (M+H) 723.2, found 723.2.

#### 産業上の利用可能性

本発明の方法によれば末端をカルボン酸残基として固相担体から切り出すことが可能なため、様々な官能基をピロールイミダゾールポリアミドに導入することが可能である。例えば、DNAに対してアルキル化能をもつデオカルマイシン、ピロロベンゾジアゼピン、プレオマイシン、エンジン化合物、ナイトロジェンマスタード、またそれらの誘導体を導入することが可能である。即ち、本発明の方法を用いることで、DNAを配列選択的にアルキル化する化合物が容易に

得られることが明らかとなった。この技術により、がん細胞種特有のDNAをターゲットとする薬物の開発、即ち、副作用のない抗がん剤の開発の進展が期待できる。また、本発明の方法によれば、天然に存在する蛋白質とピロールイミダゾールポリアミドとのコンジュゲート、更には非天然蛋白質とのコンジュゲートの合成をも可能とする。更にまた、Fmoc法はt-BOC法に比べて反応条件が緩和なため、蛋白質以外の有機化合物の中でも酸性条件で不安定な官能基を持つ化合物の導入も可能であり、その応用は幅広い。例えば、ピロールイミダゾールポリアミドとDNAやRNAとのコンジュゲート、それらの誘導体とのコンジュゲートを自動合成することも可能である。

また、FITCをピロールイミダゾールポリアミドに導入してコンジュゲートを合成することも可能であり、得られてくるコンジュゲートは、特定のDNA配列を認識出来る蛍光標識試薬として用いることが出来、がんを含めた遺伝病に関係するDNA配列を容易に識別出来る。これは、ピロールイミダゾールポリアミドを用いた治療を行なう前段階に利用出来るだけでなく、診断薬としての利用も可能である。

## 請 求 の 範 囲

1. ペプチド合成機を使用し、固相Fmoc法による自動合成法により合成することを特徴とする、ピロールーイミダゾールポリアミドの合成法。
2. 末端にカルボキシル基を有するピロールーイミダゾールポリアミドを合成する請求の範囲第1項に記載の合成法。
3. 末端にカルボキシル基を有するピロールーイミダゾールポリアミドが、末端にβ-アラニン残基又はγ-アミノ酪酸残基を有するピロールーイミダゾールポリアミドである請求の範囲第2項に記載の合成法。
4. Fmocでアミノ基を保護したアミノピロールカルボン酸類と、Fmocでアミノ基を保護したアミノイミダゾールカルボン酸類と、Fmocでアミノ基を保護したβ-アラニン又はFmocでアミノ基を保護したγ-アミノ酪酸を担持した固相担体を用いる請求の範囲第3項に記載の合成法。
5. Fmocでアミノ基を保護したアミノピロールカルボン酸類がFmocでアミノ基を保護した4-アミノ-1-メチル-2-ピロールカルボン酸であり、Fmocでアミノ基を保護したアミノイミダゾールカルボン酸類がFmocでアミノ基を保護した4-アミノ-1-メチル-2-イミダゾールカルボン酸である請求の範囲第4項に記載の合成法。
6. HATU[O-(7-アゾベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート]/DIEA(N,N-ジイソプロピルエチルアミン)系によるペプチド合成機での固相合成法により合成する請求の範囲第1項～第5項の何れかに記載の合成法。
7. 末端にカルボキシル基を有するピロールーイミダゾールポリアミド。

8. 末端に $\beta$ -アラニン残基又は末端に $\gamma$ -アミノ酪酸残基を有する請求の範囲第7項に記載のピロール-イミダゾールポリアミド。

9. Fmocでアミノ基を保護したアミノピロールカルボン酸類と、Fmocでアミノ基を保護したアミノイミダゾールカルボン酸類と、Fmocでアミノ基を保護した $\beta$ -アラニン又はFmocでアミノ基を保護した $\gamma$ -アミノ酪酸を担持した固相担体を用い、固相Fmoc法による自動合成法により合成した請求の範囲第8項に記載のピロール-イミダゾールポリアミド。

10. Fmocでアミノ基を保護したアミノピロールカルボン酸類がFmocでアミノ基を保護した4-アミノ-1-メチル-2-ピロールカルボン酸であり、Fmocでアミノ基を保護したアミノイミダゾールカルボン酸類がFmocでアミノ基を保護した4-アミノ-1-メチル-2-イミダゾールカルボン酸である請求の範囲第9項に記載のピロール-イミダゾールポリアミド。

11. 請求の範囲第7項又は第8項に記載のピロール-イミダゾールポリアミドの末端のカルボキシル基にDNAアルキル化剤を導入してなるピロール-イミダゾールポリアミド。

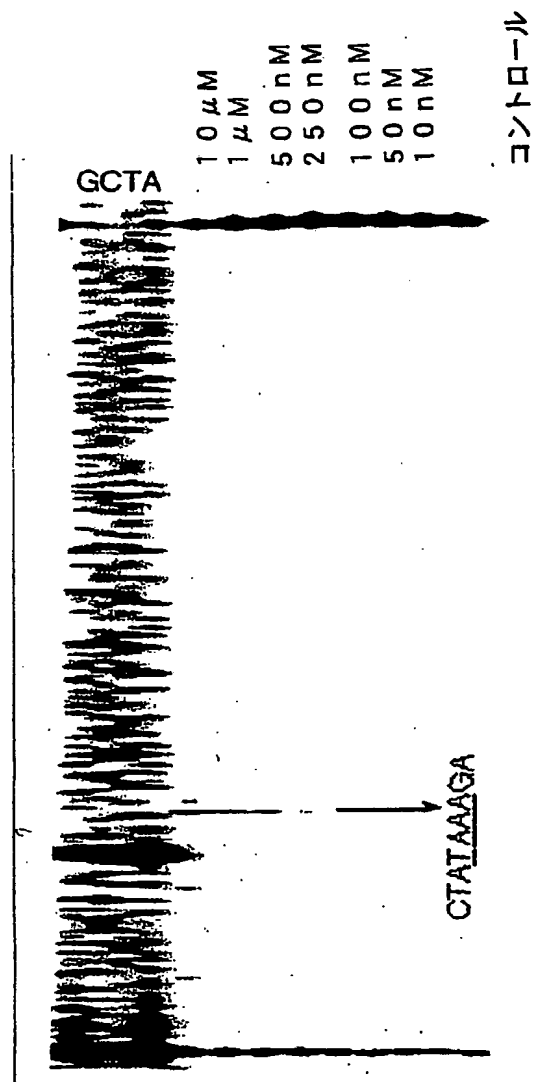
12. DNAアルキル化剤がDU-86 (2-メチル-3-メトキシカルボニル-A環ピロール-DUMA)の活性中心であるA環部(Du86)である請求の範囲第11項に記載のピロール-イミダゾールポリアミド。

13. DNAアルキル化剤を導入した請求の範囲第11項又は第12項に記載のピロール-イミダゾールポリアミドを用いることを特徴とする、配列特異的DNAアルキル化方法。

14. DNAアルキル化剤がDu-86（2-メチル-3-メトキシカルボニル-A環ピロール-DUMA）の活性中心であるA環部（Du86）である請求の範囲第13項に記載の配列特異的DNAアルキル化方法。

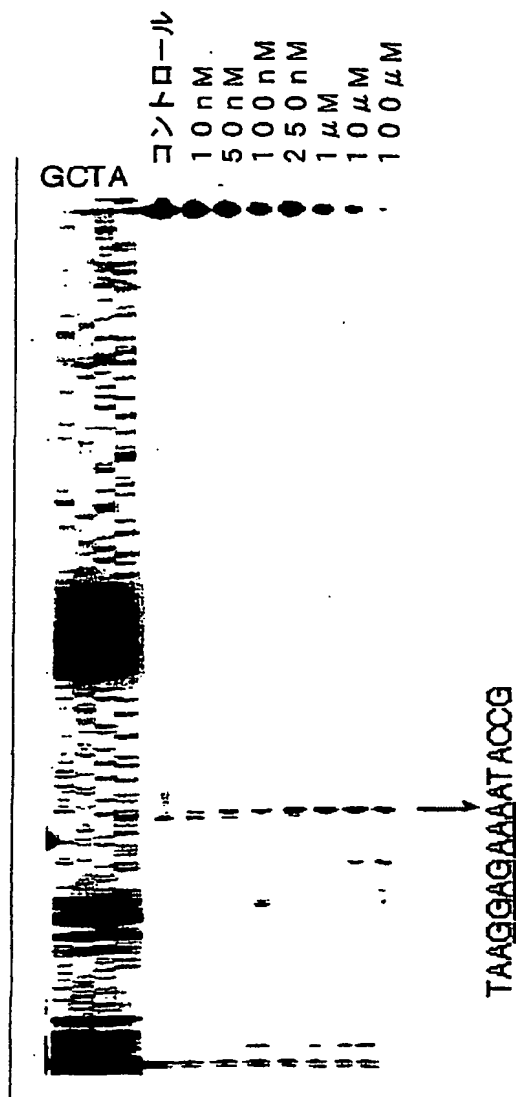
15. 末端にカルボキシル基を有するFITC（フルオレセインイソチオシアネート）-ピロール-イミダゾールポリアミドコンジュゲート。

第 1 図





第 2 図



## 第 3 図



VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、  科学技術振興事業団、杉山 弘、飯田 博一、齋藤 烈、斉藤 孝は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付：	2001年03月15日（15.03.2001）
VIII-5-1 (iii)	開示の名称：	「Fmoc法によるピロールイミダゾールポリアミドの固相合成」
VIII-5-1 (iv)	開示の場所：	日本化学会第79春季年会 講演予稿集Ⅱ
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。：	すべての指定国

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/01775

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07D403/12, 403/14, 207/34, 487/04, 405/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07D403/12, 403/14, 207/34, 487/04, 405/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS, REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Organic Letters, (2001), 3(8), p.1201-3	1 2-15
X Y	J.Org.Chem., (2000), 65(18), p.5506-13	7-10 1-6, 11-15
X Y	Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., (1995), 92(22), p.10389-92	7-10 1-6, 11-15
X Y	WO 98/45284, A1 (California Institute of Technology), 15 October, 1998 (15.10.98), & US 6090947 A & WO 97/30975 A2 & US 6143901 A & WO 98/50582 A1 & AU 9867576 A & EP 1023288 A1	7 1-6, 8-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
30 April, 2002 (30.04.02)

Date of mailing of the international search report  
21 May, 2002 (21.05.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/01775

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 98/49142 A1 (California Institute of Technology), 05 November, 1998 (05.11.98), & US 6090947 A & US 6143901 A & WO 98/50582 A1 & AU 9871040 A & EP 986539 A1	7 1-6, 8-15
X Y	WO 97/30975 A2 (California Institute of Technology), 28 August, 1997 (28.08.97), & US 6090947 A & CA 2247889 A & AU 9725268 A & EP 885189 A2 & JP 2000-503324 A & AU 9864334 A & EP 96186 A1 & HO 2001-513759 A & AU 9862552 A & WO 98/45284 A1 & AU 9867576 A & EP 973740 A1 & EP 1023288 A1	1-5, 7-10 6, 11-13
X Y	WO 98/37066 A1 (California Institute of Technology), 27 August, 1998 (27.08.98), & US 6090947 A & US 6143901 A & AU 9864334 A & EP 968186 A1 & JP 2001-513759 A	7 1-6, 8-15

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/01775

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C07D403/12, 403/14, 207/34, 487/04, 405/14

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C07D403/12, 403/14, 207/34, 487/04, 405/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CAPLUS, REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Organic Letters, (2001), 3(8), p. 1201-3	1 2-15
X Y	J. Org. Chem., (2000), 65(18), p. 5506-13	7-10 1-6, 11-15
X Y	Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., (1995), 92(22), p. 10389-92	7-10 1-6, 11-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.04.02

国際調査報告の発送日

21.05.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区蔵が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 保



4P

9159

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 98/45284, A1 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 1998. 10. 15 & US 6090947 A & WO 97/30975 A2 & US 6143901 A & WO 98/50582 A1 & AU 9867576 A & EP 1023288 A1	7 1-6, 8-15
X Y	WO 98/49142 A1 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 1998. 11. 05 & US 6090947 A & US 6143901 A & WO 98/50582 A1 & AU 9871040 A & EP 986539 A1	7 1-6, 8-15
X Y	WO 97/30975 A2 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 1997. 08. 28 & US 6090947 A & CA 2247889 A & AU 9725268 A & EP 885189 A2 & JP 2000-503324 A & AU 9864334 A & EP 96186 A1 & HO 2001-513759 A & AU 9862552 A & WO 98/45284 A1 & AU 9867576 A & EP 973740 A1 & EP 1023288 A1	1-5, 7-10 6, 11-13
X Y	WO 98/37066 A1 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 1998. 08. 27 & US 6090947 A & US 6143901 A & AU 9864334 A & EP 968186 A1 & JP 2001-513759 A	7 1-6, 8-15

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**